

USO DE LA MICOSTATINA EN EL AISLAMIENTO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

NORBERTO J. PALLERONI *

SUMMARY. Mycostatine can be used in selective media for the isolation of *Lactobacillus plantarum* from the brine of fermented olives. The antibiotic inhibits the growth of film yeasts at low concentration, and it does not seem to interfere with the normal lactic acid fermentation.

Even though the antibiotic is somewhat unstable, its action lasts long enough in the media to make it possible the isolation of the slow growing lactic acid bacteria.

La elaboración de aceitunas "tipo español" consiste en la eliminación del sabor amargo de los frutos por tratamiento con álcali, y en sumergir los frutos desamarrizados en salmuera, donde el azúcar que difunde de los mismos no tarda en sufrir fermentación láctica. El ácido láctico producido difunde a su vez a la pulpa de las aceitunas y les imparte sabor agradable.

La especie bacteriana más importante en esa fermentación es *Lactobacillus plantarum*, pero dado que una gran proporción de gérmenes de esta especie es eliminada por el tratamiento con lejía y los lavados, desarrolla una microflora muy variada, particularmente en las etapas iniciales. Así, VAUGHN y colaboradores (1) reconocen tres períodos en la fermentación. Durante el primero, mientras ocurre la difusión de las sustancias contenidas en el fruto hacia la salmuera, desarrollan una serie de gérmenes, algunos de los cuales son potencialmente causales de alteraciones de las aceitunas elaboradas. *Leuconostoc mesenteroides* pone fin al primer período y comienza a acumular ácido láctico, hasta que *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis* desarrollan finalmente y predominan en la fermentación.

Por consiguiente, la fermentación láctica es iniciada por *Leuconostoc mesenteroides*, según los autores mencionados. En nuestro país no parece ocurrir lo mismo. MERZARI y MOLINA (2) describieron el proceso de elaboración y realizaron estudios microbiológicos de las

* Profesor Titular de Microbiología Agrícola e Industrial en la Facultad de Ciencias Agrarias

salmueras en fermentación, no habiendo podido demostrar la presencia de la especie mencionada. En un número de aislamientos realizados en este laboratorio, tampoco hemos podido encontrar *Leuconostoc* por siembras en cajas de Petri con agar de agua de levaduras glucosada o en el medio recomendado por SOHNS y colaboradores (3).

Diversos autores preconizan el agregado de cultivos puros de *L. plantarum* a las salmueras bajo la forma de un pie de cuba. CRUESS (4) llega a la conclusión de que tal agregado es beneficioso y que el producto obtenido en fermentaciones de ese tipo es de mejor sabor y calidad. A la misma conclusión llegaron VAUGHN y colaboradores (1). En la Argentina, MERZARI y MOLINA (2) también utilizaron el método del agregado de pie de cuba con óptimos resultados, y consideran recomendable la práctica desde el punto de vista técnico.

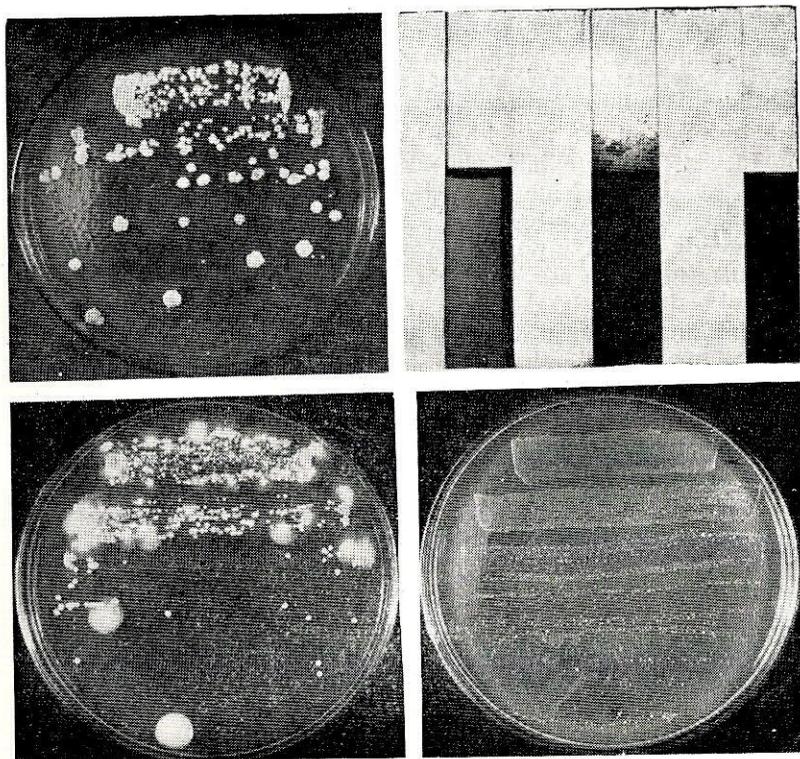
Para el aislamiento de *Lactobacillus plantarum*, lo más recomendable es partir de una salmuera de aceitunas en activa fermentación, y efectuar siembra en cajas de Petri por el método de estrías en superficie. Ese procedimiento presenta, no obstante, la desventaja de que las colonias de bacterias lácticas son a menudo tapadas por el desarrollo más rápido de las levaduras que forman velo en la superficie de las salmueras durante la fermentación. En la figura 1 puede verse una caja de Petri conteniendo el medio de agar de agua de levaduras autolizadas preparado de acuerdo a ORLA-JENSEN (5), con dos por ciento de glucosa, sembrada con una muestra de una salmuera en fermentación normal. Las colonias más pequeñas, de aspecto puntiforme, corresponden en su mayoría a *L. plantarum* y las otras colonias mayores, tanto lisas como de superficie plegada, corresponden a levaduras.

MERZARI y MOLINA (2) mencionan en su trabajo el uso de anti-sépticos tales como el aceite esencial de hinojo (y de su principio activo, el anetol) y del timol para inhibir el desarrollo de la levadura superficial sin afectar a las bacterias lácticas. En una comunicación posterior (6), estos autores dan los resultados de estudios acerca del efecto de esos antisépticos sobre la levadura; dosis entre 0,4 y 0,8 por mil del aceite de hinojo (o unas diez veces menos de timol) inhiben a las levaduras.

En la presente comunicación se dan los resultados obtenidos por el uso del antibiótico llamado fungicidina, nistatina o micostatina, descubierto en 1951 por HAZEN y BROWN en *Streptomyces noursei* (7). El antibiótico tiene una marcada acción antifúngica, y a la vez una toxicidad relativamente baja, razones que hacen que el mayor volumen de literatura sobre el particular se refiera principalmente a sus aplicaciones en medicina. No obstante, se ha ensayado su uso en enología (8, 9), campo en el cual ofrece algunas posibilidades interesantes.

Nosotros hemos ensayado una muestra gentilmente suministrada por la firma Mathieson-Atanor. De acuerdo a datos suministrados por la misma (10), cada miligramo de la droga corresponde a unas 3000 unidades valoradas según un método que consiste en establecer la acción antibiótica sobre una cepa determinada de *Saccharomyces cerevisiae*. La figura 2 muestra el efecto del agregado de unas 10 unidades por mililitro a agua de levaduras glucosada, en la cual se ha sembrado una pequeña cantidad de una salmuera en fermentación. Por comparación, a la izquierda se ve un tubo sembrado que no ha recibido el antibiótico y que muestra abundante desarrollo de levadura en superficie.

El antibiótico puede ser agregado en considerable exceso sin afectar el desarrollo de las bacterias lácticas. En las figuras 3 y 4 se muestran dos cajas de Petri en las cuales se ha sembrado el sedimento de un centrifugado de salmuera, enriquecido en bacterias lácticas



Arriba, izquierda a derecha, Fig. 1, Fig. 2. - Abajo, izquierda a derecha, Fig. 3, Fig. 4.

por agregado de un volumen de cultivo puro de *L. plantarum*. En la figura 3 se ve el resultado de la siembra en el medio sin agregados, y en la figura 4, el aspecto de una caja que ha recibido un exceso de micostatina. Una pizca de la droga, que correspondía aproximadamente a 1 miligramo, fue depositada en la caja estéril, y luego se volcó el agar fundido y entibiado, agitando para homogeneizar. Puede notarse que el desarrollo de hongos y levaduras fue inhibido totalmente, y en la caja aparecen pura y exclusivamente las colonias pequeñas de las bacterias lácticas.

En ensayos realizados con 3,6, 7,2, 18, 36 y 72 unidades por mililitro en agua de levaduras con dos por ciento de glucosa, en recipientes sembrados con igual cantidad de células de *L. plantarum* a partir de un inóculo preparado 24 horas antes, la acidez láctica producida al cabo de 36 horas fue esencialmente igual en todos los casos (de 0,42 a 0,45 g. de ácido láctico por 100 ml. de medio de cultivo). Alrededor de 8 unidades por ml. resultan inhibitorias para *Saccharomyces cerevisiae* y para especies del género *Candida*, según los informes mencionados.

No tenemos noticia de que se haya utilizado el antibiótico para el objeto descrito. Sólo hemos encontrado una referencia en la literatura sobre el uso de micostatina en medios de cultivo de tejidos (11). En nuestra opinión, la micostatina puede ser un auxiliar de valor en el aislamiento de las bacterias lácticas homofermentativas, que desarrollan en forma relativamente pobre en la superficie de los medios de cultivo, y no pueden competir con las levaduras que frecuentemente están asociadas con ellas en la naturaleza. Comparado con el aceite esencial de hinojo o con el timol, el antibiótico resulta más activo a igualdad de peso. Así, según MERZARI y MOLINA (2), (400 a 800 mg. de aceite de hinojo por litro de medio, o 40 a 80 mg. de timol por litro, inhiben a la levadura superficial. Con 3 mg. por litro de micostatina se lograrían los mismos resultados.

En el informe suministrado por los donantes de la micostatina (10) se menciona la inefectividad de la micostatina sobre el colibacilo. MERZARI y MOLINA (12) encontraron inhibición de *Aerobacter aerogenes* usando aceite de hinojo y timol. Desde ese punto de vista, y también por su inestabilidad marcada, la micostatina no parece tan conveniente como antibiótico en las condiciones de la industria, en comparación con los antisépticos mencionados.

RESUMEN

La micostatina puede ser usada en medios selectivos para el aislamiento de *Lactobacillus plantarum* a partir de salmueras de aceitunas fermentadas. El antibiótico inhibe el desarrollo de las levaduras

formadoras de película a concentraciones bajas, y no parece interferir con la fermentación láctica normal.

Aun cuando el antibiótico es algo inestable, su acción dura lo suficiente en los medios como para hacer posible el aislamiento de las bacterias lácticas, de desarrollo lento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) VAUGHN, R. H., DOUGLAS, H. C., y GILLILAND, J. R., Univ. Cal. Coll. Agr., Bull. 678, 1943.
- 2) MERZARI, A. H., y MOLINA, J. S., Ciencia e Invest. 5, 500, 1949.
- 3) SOHNS, V. E., ROGOVIN, S. P., CONWAY, H. F., y LANGFORD, C. T., U. S. Dept. Agr., Bur. Agr. and Ind. Chem., Mimeographed Circ. Ser., AIC 372, 1954.
- 4) CRUESS, W. V., Fruit Products Jour., 17, 12, 1937.
- 5) ORLA-JENSEN, S., *The lactic acid bacteria*, p. 84, Copenhagen, 1949.
- 6) MOLINA, J. S. y MERZARI, A. H., Rev. Arg. de Agron. 16, 234, 1949.
- 7) HAZEN, E. L., y BROWN, L., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 76, 93, 1951.
- 8) DI MATTEI, P. y SIESTO, A. J., Nuovi Annali d'Igiene e Microbiol., 10, 285, 1959.
- 9) RIBÉREAU-GAYON, J., PEYNAUD, E., LAFOURCADE, S. y LAFON, M., Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 189, 1958.
- 10) CHABROLIN, CH., *Note technique de documentation*, Paris, 1957.
- 11) MCLIMANS, W. F., BONISSOL, C., DAVIS, E. V., y RAKE, G., "Antibiotics Annual 1955-1956", p. 690, 1956.
- 12) MERZARI, A. H., y MOLINA, J. S., Rev. Arg. Agron., 17, 241, 1950.